

(HpL3-4) は、プリオン蛋白発現細胞 (HpL3-4TR) と比較して、円形化し変性・剥離する細胞がより多く観察された (図 1)。WST-8 法による細胞生存率の比較では、HpL3-4 と HpL3-4TR の細胞数平均値は DMSO 投与群 (control) と比較して、それぞれ 37.9 と 53.1% (投与後 24 時間) および 17.5 と 43.4% (同 36 時間) で、両細胞間で有意差が認められた (図 2)。

HpL3-4TR では Tunicamycin 処理後 6 時間を境に、プリオン蛋白は deglycosylation form へとシフトするとともに、ER ストレスマーカーである Grp78/Bip の発現量が 6 時間後から増加した。また、HpL3-4TR に比較して HpL3-4 においては Tunicamycin 処理にかかわらず、無処理の段階(0)から Grp78/Bip の発現量が高く保たれていた (図 3)。

一方、新たにマウスプリオン蛋白遺伝子を導入した HpL3-4 細胞では、Tunicamycin 処理後 36 時間で、細胞生存率が有意に高かった (図 4)。

#### D. 考察

今回の実験から、プリオン蛋白は Tunicamycin による ER ストレス誘導細胞死を緩和する機能を有することが確認された。また、無処理の状態でも HpL3-4 は Grp78/Bip が高く発現していたことから、内因性の ER ストレスの緩和にもプリオン蛋白が重要であることが考えられた。今回はこの現象の分子機構解明には至っていないが、プリオン蛋白が ER ストレスに対する細胞反応シグナルに関与していることが示されており、大変興味深い。

今後、プリオン蛋白ノックアウト細胞およびプリオン蛋白発現細胞におけるストレス付加時の遺伝子発現解析やプリオン蛋白の結合分子を同定し、ER ストレスの緩和に関与するプリオン蛋白シグナル伝達経路を詳細に検討していきたい。

#### E. 結論

正常型プリオン蛋白が ER ストレス緩和機能を有していることが示された。

#### [参考文献]

1. Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, et al. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 479-485.
2. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103.
3. Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI, et al. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 2002; 10: 55-67.
4. Hetz C, Castilla J, Soto C. Perturbation of endoplasmic reticulum homeostasis facilitates prion replication. *J Biol Chem* 2007; 282: 12725-12733.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sakaguchi S. Molecular biology of prion protein and its first homologous protein. *J. Med. Invest.* 2007; 54: 211-223.
2. Kim CK, Hirose Y, Sakudo A,

- Takeyama N, Kang CB, Taniuchi Y, Matsumoto Y, Itohara S, Sakaguchi S, Onodera T. Reduced response of splenocytes after mitogen-stimulation in the prion protein (PrP) gene-deficient mouse: PrPLP/Doppel production and cerebral degeneration. *BBRC* 2007; 358: 469-474.
3. Dong J, Li A, Yamaguchi N, Sakaguchi S, Harris DA: Doppel induces degeneration of cerebellar Purkinje cells independently of Bax. *Am J Pathol* 2007; 171: 599-607.
  4. Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, Yachi A, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. Serum withdrawal-induced apoptosis in Zrch I prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 457-466.
  5. Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 291-301.
  6. Sakaguchi S, Arakawa T. Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 75-85.
  7. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S: Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 2007; 25: 985-992.
  8. Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S. Newly established *in vitro* system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA. *Gene* 2007; 386: 139-146.
2. 学会発表
    1. 坂口末廣. 教育講演：プリオン病：その発症から治療、そして予防まで. 第18回日本臨床微生物学会総会, 長崎ブリックホール. 2007・2.17-18.
    2. 坂口末廣. 特別講演：プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第23回中国四国ウイルス研究会, 松山市道後, にぎたつ会館. 2007・6.16-17.
    3. 坂口末廣. プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第4回公開シンポジウム. 蛋白質機能制御と疾患治療戦略. 長井記念ホール (徳島大学蔵本キャンパス). 2007.11.22.
  - H. 知的財産権の出願・登録状況
    1. 特許取得  
特になし
    2. 実用新案登録  
特になし

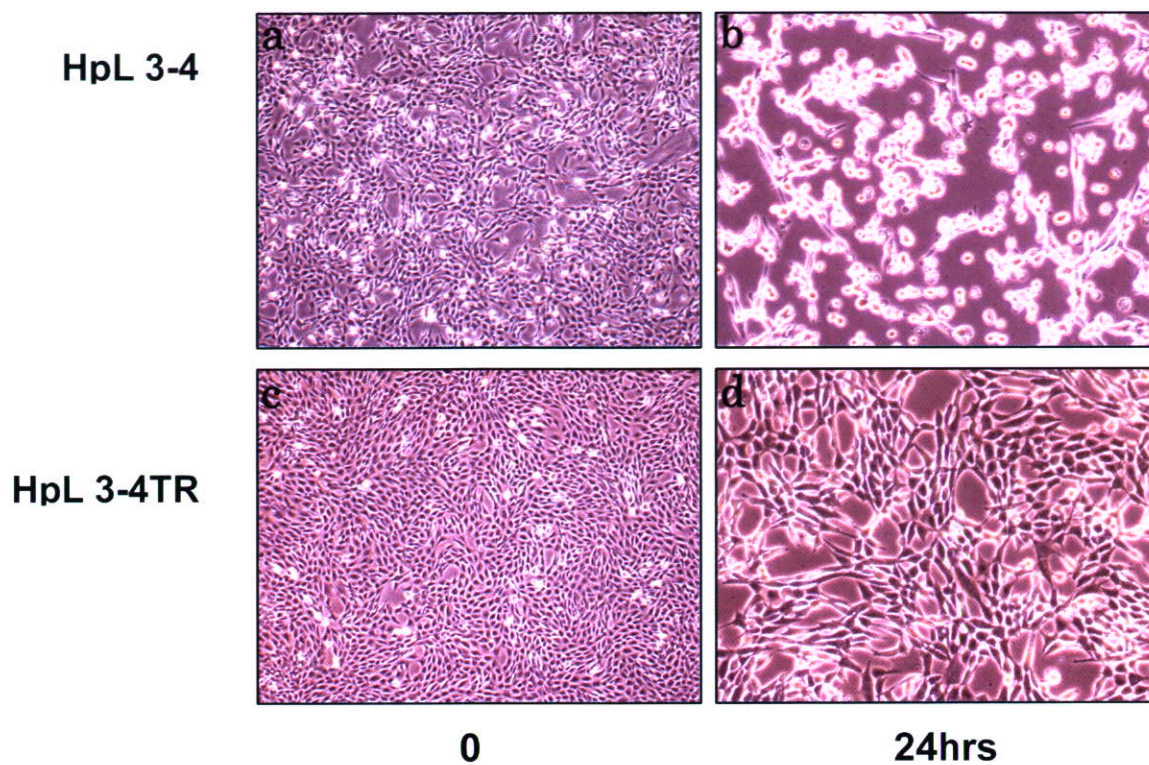


図 1. Tunicamycin 処理後 24 時間培養後の細胞形態

PrP 非発現細胞 (HpL 3-4 : 上段 a,b)、マウス PrP 発現細胞 (HpL 3-4TR : 下段 c,d)。Tunicamycin 処理前 (0 : 左側 a,c 40 倍) および処理後 24 時間 (24hrs : 右側 b,d 100 倍) の細胞像。

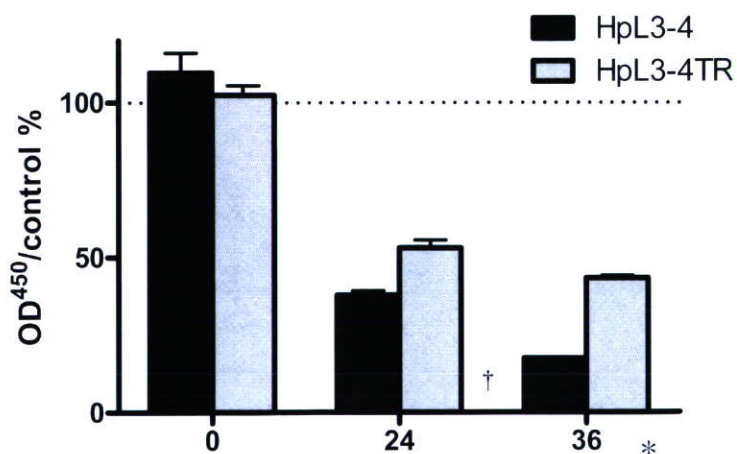


図 2. Tunicamycin 処理後の細胞生存率の経時変化 (WST-8 assay)

HpL 3-4 および HpL 3-4TR の Tunicamycin 処理前 (0)、処理後 24、36 時間 (24、36) について、細胞生存率の変化をコントロール (DMSO) 投与群と比較した。  
(† p=0.0028、\* p=0.0003)

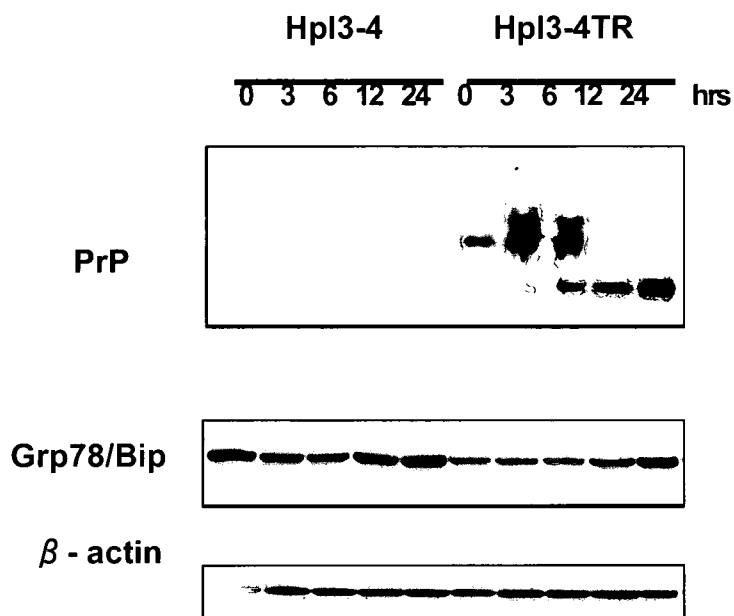


図 3. ER stress 反応の経時変化

Tunicamycin 処理後経時的に細胞を回収し、Grp78/Bip の変化量を Western blot 法により解析した。

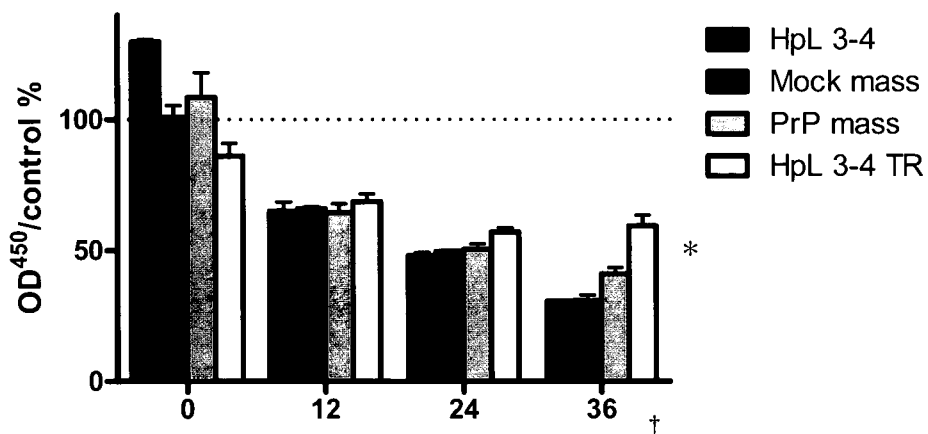


図 4. PrP 導入による細胞生存率の回復 (WST-8 assay)

Hpl3-4 にマウス PrP 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターおよびコントロールベクター (Mock) を導入し、Tunicamycin 処理後経時的に細胞生存率の変化を比較した。(† : p=0.0017、\* : p=0.0003)

## プリオンの凝集体及びアミロイド形成に関する研究

分担協力者：桑田 一夫 岐阜大学 人獣感染防御研究センター

研究協力者：山口 圭一 岐阜大学 人獣感染防御研究センター

### 研究要旨

プリオンの部分ペプチドにおける凝集体形成反応を解析し、凝集体の物理化学的性質を明らかにした。ヘリックス B（アミノ酸 172～194 残基）とヘリックス C（200～227 残基）領域のペプチドと、疎水コア（113～127 残基）領域のペプチドがアミロイド線維を形成したが、ヘリックス A 領域では、アミロイド形成は見られなかった。ヘリックス B が形成するアミロイドは針状で、構造もしっかりしていた。これを CD 及び FTIR で測定したところ、 $\beta$ シート及び $\beta$ ターン構造の形成が明らかとなった。20 残基以上の比較的長いペプチドからなるアミロイドでは、 $\beta$ ターン形成が重要な役割を果たしている、と考えられる。また、ヘリックス C は $\beta$ シートのみで $\beta$ ターンを形成せず、柔らかい凝集体を形成した。このような形態的特性は、神経毒性と深い関連がある、と考えられた。

### A. 研究目的

リコンビナントプリオンの凝集体或いはアミロイドが感染性を持ち、凝集体のサイズが感染性と相関している、と考えられている。そこで本研究ではプリオンの部分ペプチドにおける凝集体形成を調べ、その物理化学的性質、感染性、及び阻害物質を調べる。

### B. 研究方法

リコンビナントプリオンを大量発現し、凝集体を作成する。反応過程は CD、赤外スペクトル、及び光散乱で追跡する。また、生成物の構造はパルスラベル NMR 等で調べる。感染性は P3 の動物飼育施設で、マウスの脳に注入することにより調べる。

### （倫理面への配慮）

マウスの手術に際しては、痛みや苦しみを与えないよう、麻酔を行う。動物実験に関しては、岐阜大学組み換え DNA・安全委員会

において既に承認されている。

### C. 研究結果

PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換における、それぞれの領域の役割に注目してアミロイド線維形成について調べると、ヘリックス B（アミノ酸 172～194 残基）とヘリックス C（200～227 残基）領域のペプチドと、疎水コア（113～127 残基）領域のペプチドがアミロイド線維を形成した。興味深いことに、ペプチドの種類によって形成されるアミロイド線維の構造と形態がかなり異なっていた。特にヘリックス B が形成するアミロイドは針状で、構造もしっかりしていた。これを CD 及び FTIR で測定すると、 $\beta$ シート及び特殊な $\beta$ ターン構造の形成が明らかとなった。一方で、ヘリックス C は $\beta$ シートのみからなり、柔らかい凝集体を形成した。全長の PrP<sup>C</sup> を用いて、*in vitro* で線維形成について調べると、針のような線維ではなくオリゴマー状の凝集体がよく

できた。しかし、条件をしぼれば、細長いアミロイド線維が形成される場合もあり、全長 PrP<sup>C</sup> にはいくつかの形態が存在すると考えられた。さらに、これらの形態は神経毒性と関連があると考えられる。さらに、我々が開発した抗プリオン物質 GN8 は、全長 PrP<sup>C</sup> の熱安定性を高めることが明らかとなった。

#### D. 考察

当初の目的である部分ペプチドの凝集体形成を調べ、その物理化学的性質を調べることが出来た。また、低分子化合物 GN8 がプリオンの熱安定性を高めることが明らかとなった。さらに、現在、感染性を有するリコンビナントプリオン作成手法に関する知見を得ており、パルスラベルを用いた立体構造の特徴付けを行っているところである。

#### E. 結論

プリオンの部分ペプチドにおける凝集体形成、アミロイド形成反応を調べ、その物理化学的性質、感染性との関連、及び阻害物質の性質を明らかにすることが出来た。

#### [参考文献]

1. Kuwata et al. NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106-126. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (25) : 14790-5.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (2007/4/1～2008/3/31 発表)

##### 1. 論文発表

1. Werner Kremer, Norman Kachel, Kazuo Kuwata, Kazuyuki Akasaka, Hans Robert Kalbitzer. Species specific

differences in the intermediate states of human and hamster prion protein detected by high pressure NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 2007; 282: 22689-22698.

2. Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, O.Kamatari Y, Hosokawa-Muto J, Kodama K, Nakamura H.K, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, S Shirabe, Takata J, Kataoka Y, Shigeru Katamine. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11921-11926.

3. Nakamura HK, Takano M, Kuwata K. Modeling of a propagation mechanism of infectious prion protein; a hexamer as the minimum infectious unit. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 789-793.

4. Kamatari YO, Nakamura HK, Kuwata K. Strange kinetic phase in the extremely early folding process of  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Lett* 2007; 581: 4463-4467.

##### 2. 学会発表

1. Kuwata K. A hot spot in prion protein for pathogenic conversion: *Proteins: From Birth to Death*. 21st Annual Symposium of The Protein Society: July 21-25, 2007. Boston, Massachusetts, Boston Marriott Copley Place.

2. 鎌足雄司, 武藤 (細川) 淳二, 西田教行, 松本友治, 児玉耕太, 中村寛則, 桑田一夫. プリオン蛋白質の正常型構造を安定化する低分子化合物の同定 プリオン研究会, 新潟, 2007.8.25.

3. 桑田一夫, 鎌足雄司, 松本友治, 西田教行, 武藤淳二, 児玉耕太, 中村寛則, 早

野陽介 : Dynamics based drug discovery  
ープリオン病治療薬開発への応用 第46  
回 NMR 討論会,札幌, 2007.9.11.

4. 武藤 (細川) 淳二, 西田教行, 桑田一夫.  
異常型プリオン蛋白質の産生を抑制する  
低分子化合物の発見とその類縁体の効果.  
第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌,  
2007.10.21-23.
5. 鎌足雄司, 武藤 (細川) 淳二, 西田教行,  
松本友治, 児玉耕太, 中村寛則, 桑田一  
夫. プリオン蛋白質の正常型構造を安定  
化する低分子化合物の同定. 2007年プリ  
オン研究会, 新潟, 2007.8.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## 酵母を用いた異種間プリオン感染の分子機構解明

研究協力者：田中 元雅 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター  
田中研究ユニット

### 研究要旨

本研究では、シンプルなモデルとして出芽酵母を使い、そこで見出されている酵母プリオン[*PS<sup>+</sup>*]の系を用いることで、酵母プリオン Sup35 のアミロイド構造やそれが引き出すプリオン株と異種間プリオン感染の関係を明らかにすることを目的とする。本年は、そのための多様なアミロイド構造を作りだし、また、異種間プリオン感染能を評価する *in vitro* 実験系を構築した。

### A. 研究目的

酵母プリオンの系を用いて、プリオン病がまれに種間の障壁を越えて感染する分子機構の解明を目指す。特に酵母では、低効率で起こると考えられる異種間プリオン感染実験を膨大な数行うことができるという特徴を利用する。本研究では、酵母プリオン蛋白質からなるアミロイドの構造や物性と、種間を超えるプリオン感染能の関係、さらに、プリオン株と種間を超えるプリオン感染との関連を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

酵母プリオン[*PSI*]の系を用いて、*S. cerevisiae*の酵母プリオン蛋白質 Sup35 のアミロイドを様々な条件下で調製し、それらアミロイドが異なる酵母種へプリオン感染させる能力をもつかを分光学的手法で調べる。特に、Sup35 による多様なアミロイド構造を作り出し、それらの異種間プリオン感染能を迅速に調べる実験系を構築する。

### (倫理面への配慮)

特になし

### C. 研究結果

*S. cerevisiae* の Sup35 は、*C. albicans* など他種の酵母由来の Sup35 とは cross-seeding しないことをまず確認した。次いで、Sup35 蛋白質のアミロイドに特異的に結合する色素を用いて Sup35 アミロイド構造の多様性を迅速に評価する実験系を作った。さらに、その方法で異なる構造をもつと考えられたアミロイドに対して、異種間プリオン感染能を調べるスクリーニング実験の系を構築した。

### D. 考察

本研究によって多様なアミロイド構造を作り出せる可能性が示された。今後、*in vitro* の実験だけでなく、Sup35 アミロイドを酵母に直接導入することで、*in vitro* の実験を確認する必要があると思われる。また、アミロイド化の条件をさらに変え、アミロイド構造のスクリーニングおよび異種間プリオン感染能の実験を続けていく予定である。

### E. 結論

酵母を用いた本実験系は、種間障壁を超えるプリオン感染の分子機構解明、プリオン株



と異種間プリオン感染の相互関係の解明に有用であると考えられる。

#### [参考文献]

1. Motomasa Tanaka, Sean Collins, Brandon Toyama, Jonathan S. Weissman. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 2006: 442 ; 585-589.
2. 田中元雅. 酵母プリオン[PSI+]の系を用いたプリオン感染・伝播機構の解明. In: 高橋良輔・編, 神経変性疾患のサイエンス, 東京, 南山堂, 2007 ; 129-138.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Michele McDobald, Amy Kendall,

Motomasa Tanaka, Jonathan S. Weissman and Gerald Stubbs. Enclosed chambers for humidity control and sample containment in fiber diffraction. *J. Appl. Cryst.* 2008 : 41 ; 206-209.

2. 田中元雅. 酵母を使ってプリオン病を理解する. *化学と生物*. 2007: 45 ; 676-678.

##### 2. 学会発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## プリオン感染および治療に伴って発現が変動する遺伝子の解析

分担研究者：三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター  
分担研究者：毛利 資郎 動物衛生研究所・プリオン病研究センター  
研究協力者：宮本 智美 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター  
研究協力者：村本 環 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野  
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野

### 研究要旨

プリオン病の感染初期には異常感染型プリオンタンパク ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) の増幅など生体の特異的な反応が予想されることから、関与する分子を捕捉する目的で、プリオン持続感染マウス神経芽細胞腫株 (ScN2a) の治療および再感染で発現の変動を示す遺伝子を検索してきた。特に、再感染実験で細胞密度に関係なく感染に伴って高発現を示した 6 遺伝子について、発現抑制および強制発現が  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖にどのような影響を与えるかプリオン高感受性クローン (ScN2a-5) を用いて検討した。siRNA 導入によりその発現が抑制されると  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖を促進する傾向を示した。逆に間接的に発現が促進されると  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖が抑制されたことから、これらの遺伝子（産物）が異常タンパク反応、あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つことと矛盾しないと考えられた。逆にその一部の遺伝子を強制発現させたところ、約 2.5-4 倍の発現増強が認められ、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の増殖は抑制されたが、 $\text{PrP}^{\text{C}}$  mRNA の発現低下に起因する可能性があった。

### A. 研究目的

開発されたプリオン病治療法の効果を高めるためには、早期診断あるいは他の脳神経変性疾患との鑑別、更に  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の伝達・増殖機構の解明が必須である。我々は、プリオン病の感染初期には異常感染型プリオンタンパク ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) の伝播・増幅など生体の特異的な反応を示すと仮定し、関与する分子を捕捉する目的で、マウス接種実験で発現の変動を示す遺伝子を検索してきた。また、ScN2a 細胞を用いて試験管内感染や治療の実験を行い、 $\text{PrP}^{\text{C}}$  の構造変換に関与する分子、あるいは早期診断や発症機構の解明、治療に有用な分子を把握する目的で遺伝子発現プロファイリング、さらに Real time-PCR により定量的解

析を行った (図 1)。細胞の再感染実験で培養時の細胞密度に関係なく感染に伴い高発現を示した 6 遺伝子を中心に、その発現抑制および強制発現が  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖にどのような影響を与えるかプリオン高感受性クローン (ScN2a-5) を用いて検討した。

### B. 研究方法

本研究班分担研究者堀内基広博士より分与されたプリオン高感受性クローン (ScN2a-5) を用い、siRNA 導入による 6 遺伝子 (図 1 および表 1) の発現抑制が  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  増殖にどのように影響するか解析した。24-well plate で培養した ScN2a-5 に各々の siRNA (80nM, Dharmacon 社 siGENOME

SMART pool) を Lipofectamine および Opti-MEM 混合溶液としてトランスフェクトし、24 時間培養した後に等量の DMEM を加えてさらに 48 時間培養した。各々の well について細胞数測定、あるいは RNA 抽出、可溶化粗タンパク画分の回収を行った。PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量は、可溶化粗タンパク画分をプロテアーゼ K 処理した後、堀内基広博士より分与された抗 PrP モノクローナル抗体 mAb31C6 を用いたイムノブロットにより解析した。相対的 PrP<sup>Sc</sup> 量は、イムノブロットで可視化されたスポットを image J でデンストメトリーして取り込み、細胞数当たりの相対値として表した。

Sdf2l1 および Nup43, Ugcg は各々の cDNA を強制発現ベクター pCAG-IRES-Pac-PolyA のプロモーター直下にクローニングし、直鎖状に処理した後エレクトロポレーション (0.8kV, 3 $\mu$ F) により ScN2a-5 に導入した。翌々日からピューロマイシン (1.5 $\mu$ g/ml) を含む DMEM で培養し 10 日目から薬剤耐性クローンを回収した。前述の siRNA による抑制実験同様、抗生物質不含 DMEM で 3 日間培養した後、細胞数測定、あるいは RNA 抽出、可溶化粗タンパク画分の回収を実施し相対的 PrP<sup>Sc</sup> 量を測定した。

### C. 研究結果

表 1 に示した 6 遺伝子および Npdc1 (neural proliferation, differentiation and control 1, 神経細胞の増殖分化を制御する), Ugcg (glucosylceramide synthase, スフィンゴ糖脂質合成経路の最初のステップでセラミドにグルコースを転移する酵素) の siRNA を ScN2a-5 細胞にトランスフェクトしてその PrP<sup>Sc</sup> 蓄積に対する影響を調べた。その結果、各々の mRNA 発現量はほぼ 60%以下に減少する一方、PrP<sup>C</sup>mRNA の量は 80~110% の範囲に維持されていた。また、無処置群と

比較して、ScN2a-5 細胞の増殖率は Npdc1 および Ugcg siRNA を添加した時に上昇したものの、不変 (Afg3l1 および Nup43, Sdf2l1) かむしろ低下する (Cdca3 および Ppp1cb, Surf4) 傾向にあった。この条件下で相対的 PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量を測定・算出したところ、siRNA の導入によって逆に 120~150%に増加していた (図 2)。対照として用いた Ugcg の siRNA を導入した場合のみ相対的 PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量が 70%に減少したが、その際、Npdc1 以外の 6 遺伝子の発現は増強していた。

Nup43, および, Sdf2l1, Ugcg を ScN2a-5 プリオン高感受性株化細胞に導入すると、各々の遺伝子の発現は約 2.5-4 倍増強した。Nup43, および, Sdf2l1 が高発現すると、PrP<sup>Sc</sup> の増幅が 20%程度抑制されたように見えたが、細胞の増殖率の低下と共に PrP<sup>C</sup>mRNA 自身の発現も低下していた (図 3)。

### D. 考察

本来は再感染実験に用いた系で siRNA トランスフェクションによる遺伝子の発現抑制とその PrP<sup>Sc</sup> 蓄積への影響を検討すべきであるが、樹立されたプリオン高感受性クローン ScN2a-5 における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積の増強が基本的には感染と同様の機構に依存していると考え、ScN2a-5 を利用した。

遺伝子発現プロファイルから選択された 6 遺伝子ではなく、任意に用いた Ugcg 遺伝子でのみ PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の抑制が認められた。6 遺伝子は、siRNA による発現の抑制の結果、細胞増殖は低下する傾向にあるにもかかわらず、相対的 PrP<sup>Sc</sup> の蓄積量は増加した。機構は全く不明であるが、Ugcg 遺伝子の発現を抑制した際には、その他の 6 遺伝子の発現が高くなっていることが判明している。これらの遺伝子 (産物) は、凝集化した PrP<sup>Sc</sup> を反応可能な状態に触媒する可能性があるものの、異常タンパク反応、あるいはシャペロン活性化、小胞体関連分解など、たんぱく質の品質

管理や細胞内輸送に関連する機能を持つと考えられており、PrP<sup>Sc</sup>が増幅されつつある細胞内での生体側の反応として矛盾しないとも言える。

一方、6 遺伝子の中でも特に培養時の細胞密度に関係なく感染に伴い高発現を示した Nup43 および Sdf2l1 遺伝子、対照として Ugcg を強制発現ベクターに組み込み ScN2a-5 に導入した。それらに次いで高発現する Cdca3 あるいは Ppp1cb は、もともと mRNA 発現量が顕著に高い (図 1) ことから今回の実験に使用しなかった。Nup43 および Sdf2l1 遺伝子の発現増強により、一見 PrP<sup>Sc</sup> が減少した印象を受けたが、細胞増殖率の低下に加え、PrP<sup>c</sup>mRNA の量も減少していることが原因であることを否定できない。一般的に、抑制系の実験よりも高発現の影響を比較解析することは容易でなく、明らかな影響を調べるためには、転写レベルで 2.5-4 倍程度の発現増強では不十分かもしれない。

これらの分子がプリオン感染初期に特徴的バイオマーカーとしての可能性を持つか、また、強制発現により PrP<sup>c</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への構造変換・増幅、およびその抑制・阻害に関与するかさらに慎重に検討する必要がある。

## E. 結論

細胞再感染実験で感染に伴い高発現を示した 6 遺伝子および Npdc1 は、その発現が抑制されると ScN2a-5 の PrP<sup>Sc</sup> 増殖が助長される傾向を示した。逆に間接的であっても、それらの発現が促進されると PrP<sup>Sc</sup> 増殖が抑制されたことから、これらの遺伝子 (産物) が、たんぱく質の品質管理や細胞内輸送に関連する機能を持つことと矛盾しないと考えられた。同様に、ScN2a-5 を用い、6 遺伝子のうち Nup43 および Sdf2l1 遺伝子の強制発現による PrP<sup>Sc</sup> 増殖への影響を調べたが、決定的な抑制効果は認められなかった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takahashi RI, Kuramochi T, Aoyagi K, Hashimoto S, Miyoshi I, Kasai N, Hakamata Y, Kobayashi E, Ueda M: Establishment and Characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. Transgenic Res 2007; 16 (1) : 115-120.
2. Murakami M, Ohba T, Wu TW, Fujisawa S, Suzuki T, Takahashi Y, Takahashi E, Watanabe H, Miyoshi I, Ono K, Sasano H, Ito H, Iijima T. Modified sympathetic regulation in N-type calcium channel null-mouse. Biochem Biophys Res Commun 354: 4: 1016-1020.
3. Sasaki N, Hosoda Y, Nagata A, Ding M, Cheng JM, Miyamoto T, Okano S, Asano A, Miyoshi I, Agui T. A mutation in tpst2 encoding tyrosylprotein sulfotransferase causes dwarfism associated with hypothyroidism. Mol Endocrinol 2007; 21 (7) : 1713-1721.

### 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

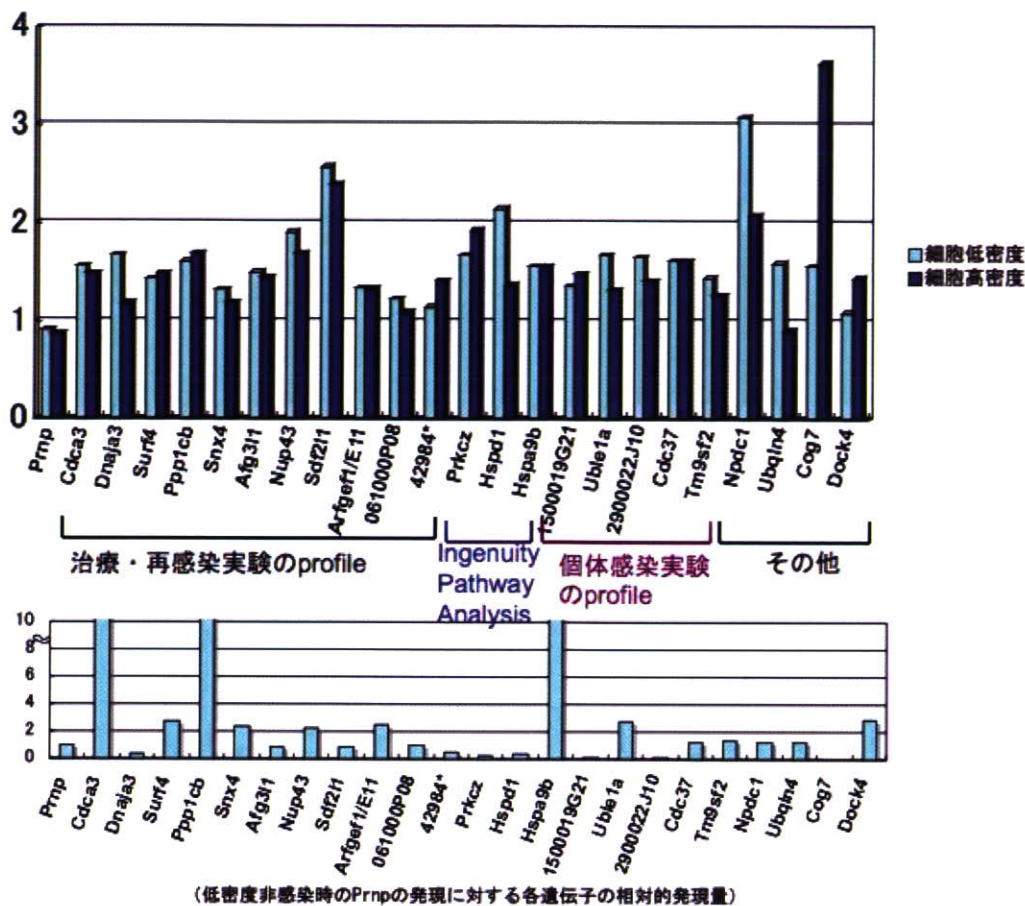


図 1. 細胞密度非依存的に感染・非感染で発現に差があった遺伝子

感染あるいは非感染細胞の間で発現の変動を示す 11 遺伝子、および、Ingenuity Pathway Analysis によってそれらとの相互作用が示唆される遺伝子、個体接種実験で選択された遺伝子などの中から任意に選び出した 37 遺伝子について、再感染させた後、細胞濃度を変えて継代した細胞から抽出した RNA をテンプレートとし TaqMan probe 用 Real time-PCR を実施した

表 1. 再感染実験で変動を示した遺伝子

stromal cell-derived factor 2-like 1(Sdf2l1) : O-mannosyltransferase活性を有する Pmt/rt protein family memberの一つでUPR pathwayで誘導され、DnaK Cochaperone と相互作用。

nucleoporin 43(Nup43) : mRNAやタンパクの輸送に関与する核膜孔複合体を形成すると考えられている nucleoporinの一つ。

protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform(Ppp1cb) : セリン・スレオニンフォスファターゼの一つで、ポリグルタミンを含むペプチドの分解に関与か？。

AFG3(ATPase family gene 3)-like 1 (yeast)(Afg3l) : ATP-dependent zinc metalloprotease familyと高いホモログを示すタンパクをコードする。ミトコンドリアに局在する。

surfeit gene 4(Surf4):SURF4 family memberでこの酵母のホモログはER-Golgi輸送において、小胞を形成および小胞輸送に関与している。

cell division cycle associated 3(Cdca3) : cell cycleを制御、ユビキチン化に関与。

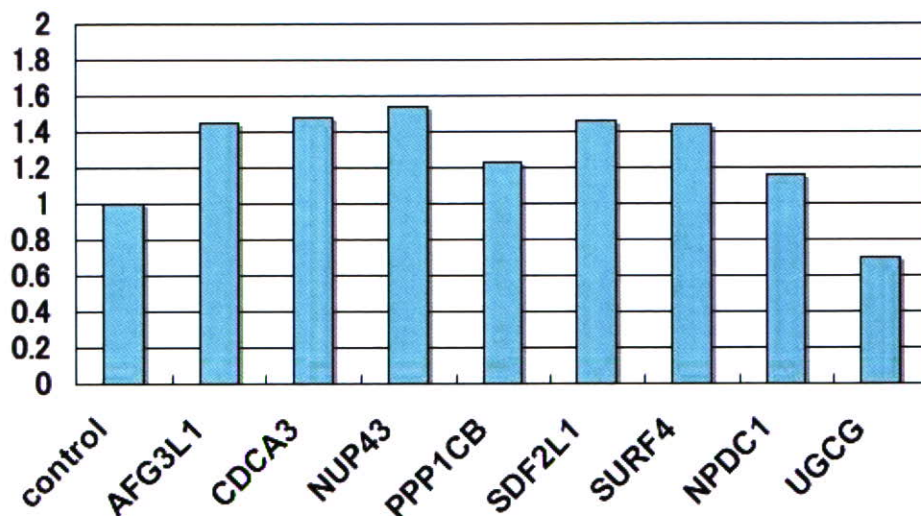


図 2. 相対的 PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量

各々の siRNA を ScN2a-5 細胞株へトランスフェクトし、PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量をイムノブロットにより解析した

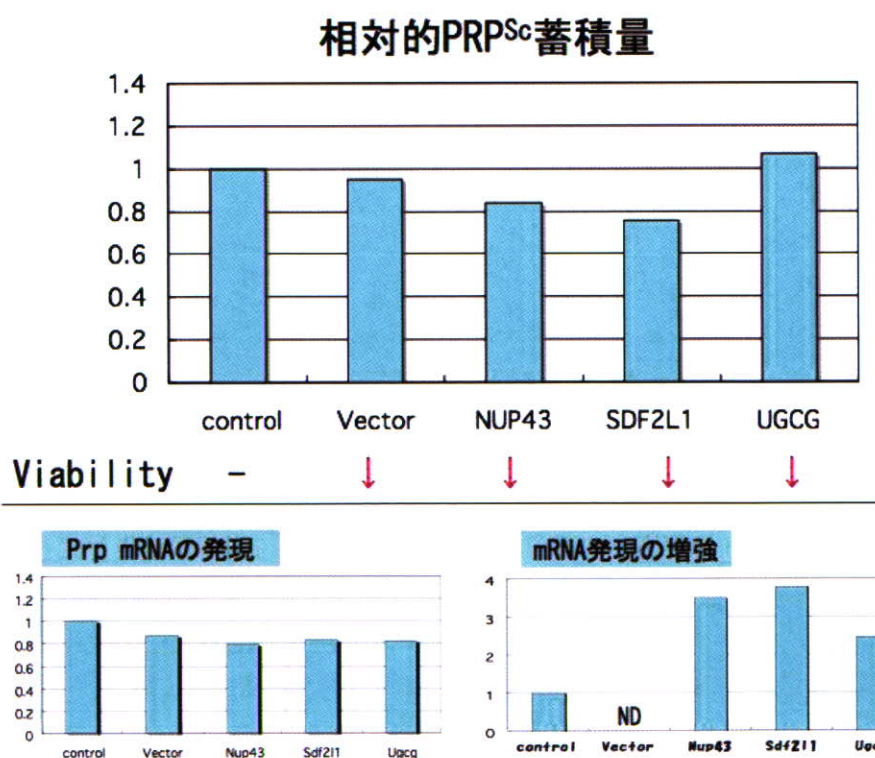


図 3. 遺伝子高発現の相対的 PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量への影響

発現ベクターに組み込んだ Nup43 および Sdf211, Ugcg を ScN2a-5 細胞株へトランスフェクトし、各々のクローンで増殖率、および、導入遺伝子の発現、PrP<sup>C</sup>mRNA の発現、PrP<sup>Sc</sup> 蓄積量を解析した

## プリオン感染マウスの脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態

分担研究者：堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

研究協力者：宋 昌鉉 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

研究協力者：長谷部理絵 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

研究協力者：本望 修 札幌医科大学医学部脳神経外科学教室

### 研究要旨

抗 PrP 抗体をプリオン Chandler 株感染マウスの脳室内に投与した場合、発病初期に投与を開始した場合でも、ある程度の延命効果が得られる。しかし、抗体の分布は限局的である。従って、抗体を病変部位に効率よく投与できるならば、治療効果の向上が期待できる。また、プリオン病の治療には、プリオンの増殖抑制作用に加えて、変性した神経組織の修復作用を併せ持つ方法が必要と考えられる。本研究では、骨髄由来間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells, MSC）が、脳梗塞などの神経変性部位に集ぞくして、神経栄養因子などを分泌して神経保護・修復作用を発揮することに注目し、プリオン病治療への応用の可能性について検討した。Chandler 株感染マウス（接種後 120 日）の左側海馬に MSC 移植した場合、移植 7 日後には、非移植側（右側）の海馬でも MSC が検出されるようになった。また、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が顕著である視床背外側への MSC の移動を調べたところ、移植 7 日後には、非移植側（右側）の視床背外側でも MSC が検出された。また、Chandler 株感染マウスに MSC を末梢から投与した場合は、脳内に MSC が検出されたが、非感染マウスに投与した場合は殆ど検出されなかった。さらに、MSC は Chandler 株感染マウス脳内で brain derived neurotropic factor (BDNF) や neurotrophin 3 (NT3) を産生し、一部の MSC はアストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞、あるいはオリゴデンドロサイトのマーカーである CNPase 陽性細胞に分化することが確認できた。以上の結果から、MSC はプリオン増殖抑制活性を有する蛋白のベクターとして機能する可能性、プリオン病の神経病変部位で神経保護作用を発揮する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々は、プリオン病の治療法モデルの確立を目的として、抗 PrP 抗体のプリオン病治療への応用について検討してきた。Chandler 株感染マウスに抗 PrP 抗体を脳室内投与した場合、発病初期から脳室内投与を開始した場合でも、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積および神経変性の進行が遅延することを見出した<sup>1)</sup>。しかし、PrP<sup>Sc</sup> の蓄積阻害により病気の進行を遅延す

ることは出来るが、病気からの回復を考慮すると、神経保護作用および変性神経組織の修復作用が期待できる治療法の導入が必要と考えられる。骨髄由来間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells, MSC）は、脳梗塞、脳腫瘍、あるいは神経変性疾患の病変部に集ぞくし、神経栄養因子の産生による神経保護作用、血管成長因子の産生による血管新生作用、あるいは MSC が神経系細胞やグリ

ア系細胞に分化し神経修復を進める神経修復作用などにより、変性神経組織の再生を促す性質を有する<sup>2)</sup>。MSCがプリオン病の神経病変部位を認識して集ぞくするならば、変性神経組織の再生に加え、プリオン増殖阻害活性因子のベクターとしても応用が期待できる。そこで、プリオン感染マウスの脳組織にMSCを移植し、MSCがプリオン病の神経病変を認識して集ぞくするか否かを検討した。また、プリオン感染マウス脳内における神経栄養因子の分泌やMSCの分化についても解析した。

## B. 研究方法

スクレイパーObihiro株およびChandler株を用いた。これらプリオン株を脳内接種したICRマウスを実験に使用した。

ヒトテロメラーゼサブユニット(hTERT)により不死化したヒト骨髄由来h-tert-MSCを使用した。h-tert-MSCはlacZ遺伝子を安定的に発現しているため、MSCは抗β-gal抗体により検出可能である。

マウスを麻酔下で脳固定装置に保定し、電動ドリルで頭蓋骨に穴を空け、マニピュレーター固定した33Gハミルトンシリンジを用いて、h-tert-MSC(10<sup>4</sup>個/2μl)を左側海馬あるいは視床に移植した。あるいは5 x 10<sup>5</sup>個のh-tert-MSCを尾静脈より投与した。

移植後一定期間を経た後、脳を採材しOCT compoundに包埋した。クリオスタットにて20μmの凍結切片を作製した。Alexa488標識抗β-gal mAb (Promega)を用いてh-tert-MSCを染色した。また、抗BDNF抗体(Chemicon)、抗NT3抗体(Chemicon)、抗MAP2 mAb (Sigma)、抗GFAP抗体(Dako)、抗CNPase mAb (Chemicon)と抗β-gal mAbの蛍光二重染色を行った。抗MAP2 mAbおよび抗CNPase mAbはAlexa546標識抗マウスIgGで、他の抗体はAlexa555抗ウサギIgGで検出した。核はpropidium iodideあるいはDAPIで染色した。

蛍光染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## (倫理面への配慮)

プリオン持続感染細胞を用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている(実験番号2006-1-41)。また、動物実験は北海道大学大学院獣医学研究科の実験動物委員会で承認された動物実験計画書(実験番号7045)に従って実施した。

## C. 研究結果

接種後120日のObihiro株あるいはChandler株感染ICRマウスの左側海馬にMSCを移植した場合、移植側(左側)に加えて、移植後7日目から非移植側(右側)の海馬でもβ-gal陽性のMSCが検出された。その後MSCは観察期間中(移植後21日目)投与側および非投与側で検出された。非感染マウスの海馬に移植した場合は、移植側(左側)ではMSCが検出されたものの非移植側では殆ど検出されなかった。MSCをプリオン感染マウスの視床背外側(左側)に移植した場合も、移植後7日目には非移植側でMSCが検出されるようになり、その後観察期間中(移植後21日目)まで投与側および非投与側で検出された(結果は示さず)。

MSCをChandler株感染マウス(接種後120日)の尾静脈に投与した場合、投与後2日目から中枢神経系組織でMSCが検出されるようになり、投与後21日目には大脳皮質、海馬、視床、小脳、延髄で両側性にMSCが検出された(図1)。一方、MSCを非感染マウスにivした場合は、僅かにMSCが検出されるのみであった(図1)。

MSCを海馬あるいは視床に移植した場合、大脳皮質へのMSCの移動は効率が悪かったが、MSCをivした場合は、大脳皮質へも効率よく分布した(結果は示さず)。以上の結果から、MSCはプリオン病の病変部へ移動し



て、そこで長く定着することが明らかとなった。

次に、マウス脳内に移植した MSC が神経栄養因子を産生するかについて調べた。非感染マウスの海馬に移植した MSC と比較して、Obihiro 株感染マウスに移植した MSC では BDNF の産生が亢進していた。また、同様に NT3 の産生も亢進していた (図 2)。従って、MSC はプリオン病の病変に応答して神経栄養因子を産生することが示唆された。

また、MSC が神経系あるいはグリア系細胞が分化するかについて検討した。Obihiro 株感染マウスの海馬では MSC の一部が GFAP 陽性、また大脳皮質では CNPase 陽性になった像が認められた (図 3)。

#### D. 考察

プリオン感染マウスの脳に MSC を移植した場合、非移植側海馬や視床でも MSC が検出された。また、MSC を尾静脈から投与した場合でも、プリオン感染マウスの脳内に MSC が分布した。Obihiro 株と Chandler 株を比較した場合、Chandler 株では視床下部における病変が軽度である。MSC の分布も病変の程度に一致しており、Chandler 株感染マウスにおける視床下部への分布は Obihiro 株感染マウスと比較すると軽度であることから (結果は示さず)、MSC はプリオン病の病変部に集ぞくする性質を有することが明らかとなった。この結果は、MSC がプリオン増殖抑制活性を有する抗体や変異 PrP を病変部に効果的に運搬するベクターになり得ることを示唆している。

また MSC は、プリオン感染マウスの脳内で、BDNF や NT3 などの神経栄養因子を産生することから、MSC がプリオン病の病変部を認識して移動し、神経保護作用を発揮し得ることが示唆された。しかし、h-tert-MSC を移植したプリオン感染マウスでは延命効果が認められなかつたことから、MSC 単独での

治療効果は期待できないと考えられる (結果は示さず)。今後、抗 PrP 抗体や変異 PrP を発現する MSC を作製し、プリオン病の治療効果を検討する予定である。

#### E. 結論

MSC はプリオン感染マウスにおいて、病変部へ移動し、そこで長く定着することが明らかとなった。さらに、MSC はプリオン病の病変に応答して BDNF や NT3 などの神経栄養因子を産生すること、またアストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化し得ることが明らかとなった。これらの結果から、MSC がプリオン増殖抑制活性を有する蛋白のベクターとして機能する可能性、およびプリオン病の神経病変部位で神経保護作用を発揮する可能性が示唆された。

#### [参考文献]

1. Song, C.-H., Furuoka, H., Kim, C.-L., Ogino, M., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Intraventricular infusion of anti-PrP mAb antagonized PrP<sup>Sc</sup> accumulation and delayed disease progression in prion-infected mice. (in revising process)
2. Prockop, D. J., Gregory, C., A, and Spees, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 Suppl 1:11917-11923, 2003.

#### F. 健康危険情報

本研究の実施に起因する、健康上の問題を生じた事例は発生していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Uryu M, Karino A, Kamihara Y,

- Horiuchi M. Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones. *Microbiol. Immunol* 2007; 51: 661-667.
2. Ohara J, Tokari T, Kurokawa A, Maeda J, Ishiguro N, Furuoka H, Horiuchi M. Frequencies of PrP genotypes in meat breeds of Japanese sheep and trail of selective breeding in experimental sheep flock. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 1325-1329.
  3. Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Anal Biochem* 2007; 370: 131-141.
  4. Watanabe Y, Hiraoka W, Shimoyama Y, Horiuchi M, Kuwabara M. Instability of familial spongiform encephalopathy-related prion mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 244-249.
  5. 堀内基広. プリオン. *臨床とウイルス* 2007; 35: 293-300.
  6. 中満智史, 堀内基広. 牛海綿状脳症. *臨床とウイルス* 2007; 35: 301-310.
  7. 堀内基広, 中満智史. ヒト以外のプリオン病 -特にウシ海綿状脳症について-. *日本臨床* 2007; 65: 1513-1520.
2. 学会発表
    1. Song C-H, Furuoka H, Suzuki A, Ogino M, Horiuchi M. Effect of intraventricular infusion of anti-PrP mAbs on the disease progression in scrapie-infected mice. *Neuro Prion* 2007. Edinburg, Sept 26-28, 2007.
    2. Nakamitsu S, Kurokawa A, Uryu M, Horiuchi M. Cell-density-dependent fluctuation of PrP-res in prion-infected Neuro2a cells. *Neuro Prion* 2007. Edinburg, Sept 26-28, 2007.
    3. Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. The 14th International Symposium for Zoonosis Control. -Prescription for fighting against zoonoses-, Sapporo, Oct 31, 2007.
    4. 進藤 亮, 山河芳夫, 佐多徹太郎, 横山隆, 古岡秀文, 堀内基広. 日本で発生した BSE 由来 PrPSc の生化学的性状の解析. 2007 年プリオン研究会, 津南, 2007.8/25-26. 新潟.
    5. 中満智史, 黒川 彩, 瓜生匡秀, 堀内基広. プリオン持続感染細胞内における異常型プリオン蛋白質の量的変動. 第55回日本ウイルス学会, 札幌, 2007.10.21-23.
    6. 宋 昌鉉, 古岡秀文, 鈴木章夫, 長谷部理絵, 前田秋彦, 堀内基広. 抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病の治療効果. 第55回日本ウイルス学会, 札幌, 2007.10.21-23.
    7. 瓜生匡秀, 堀内基広. 神経芽腫細胞 Neuro2a サブクローンにおけるプリオンの細胞間伝播. 第55回日本ウイルス学会. 札幌, 2007.10.21-23.
    8. 堀内基広. プリオンの増殖とその抑制. 第55回日本ウイルス学会. 札幌, 2007.10.21-23.
  - H. 知的財産権の出願・登録状況
    1. 特許取得  
特になし
    2. 実用新案登録  
該当なし

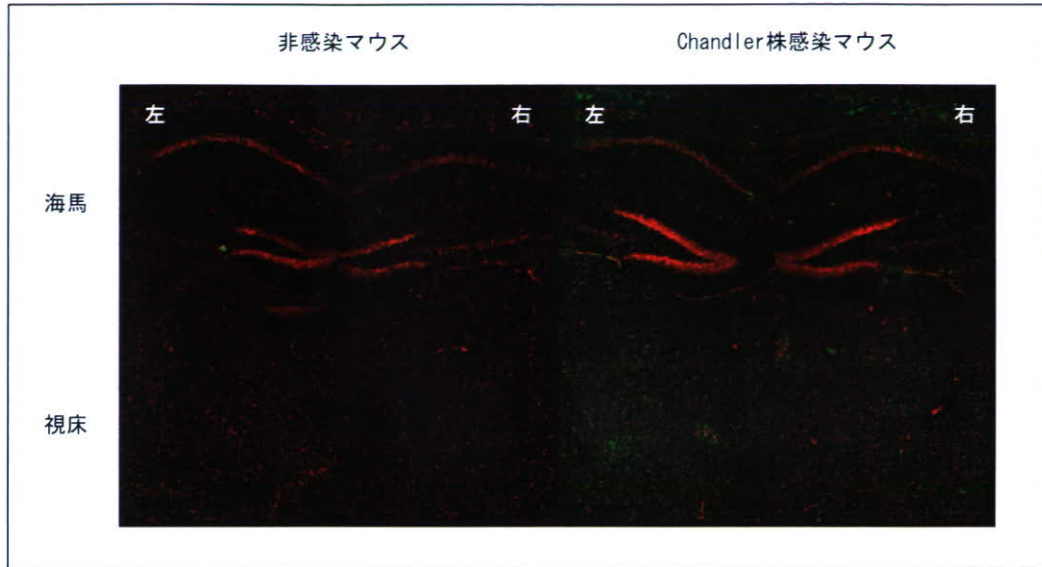


図 1. 尾静脈投与した MSC の脳内分布

Chandler 株感染マウス（接種後 120 日）および非感染マウスの尾静脈から MSC を投与した。3 週間後、凍結切片を作製し、抗 $\beta$ -gal 抗体で MSC を検出した。核は PI に対比染色した。図は海馬と視床における MSC の分布を示す。

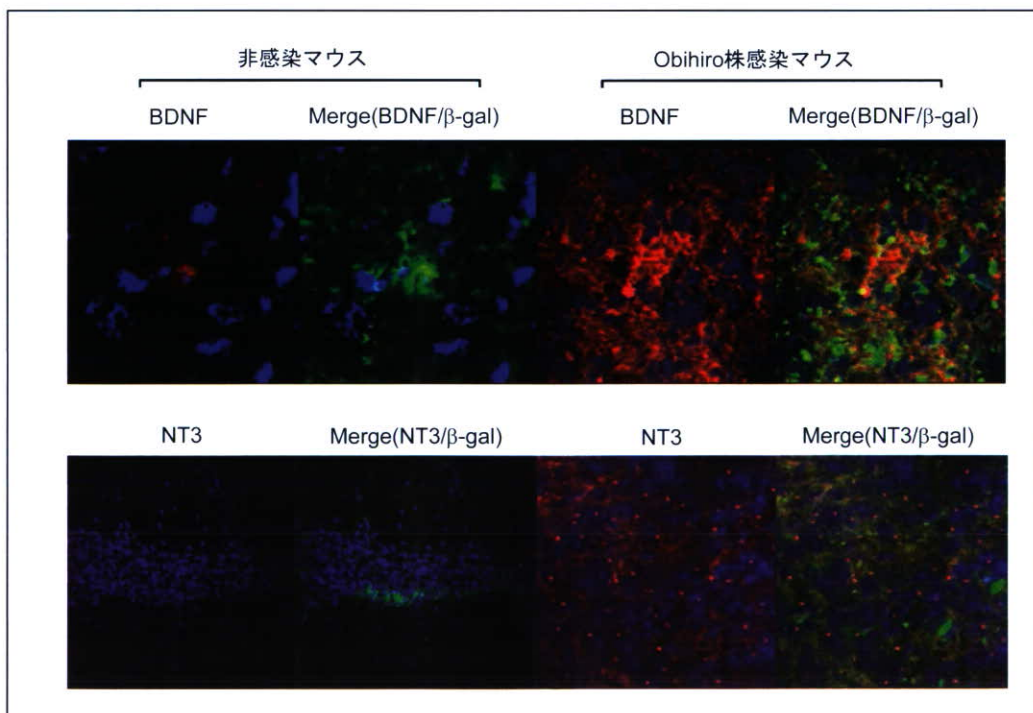


図 2. 神経栄養因子の産生

Obihiro 株感染マウス（接種後 120 日）の海馬に MSC を移植した。3 週間後に凍結切片を作製し、抗 BDNF 抗体あるいは抗 NT3 抗体と抗 $\beta$ -gal 抗体で蛍光二重染色を行った。

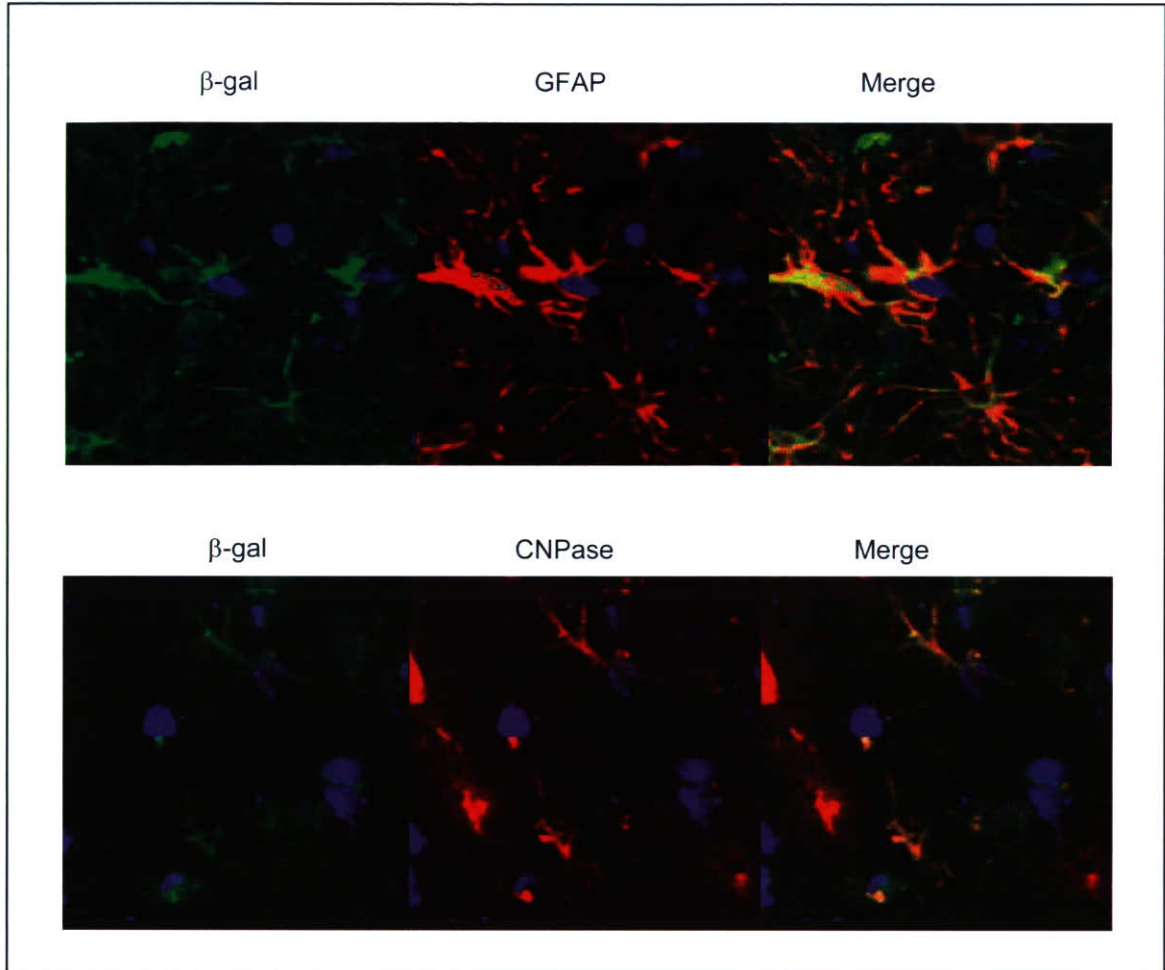


図 3. MSC の分化

Obihiro 株感染マウス（接種後 120 日）の海馬に MSC を移植した。3 週間後に凍結切片を作製し、抗 GFAP 抗体あるいは抗 CNPase 抗体と抗β-gal 抗体で蛍光二重染色を行った。